

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 13 APR 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 14 780.2
Anmeldetag: 19. März 2003
Anmelder/Inhaber: KTB Tumorforschungs GmbH,
79106 Freiburg/DE
Bezeichnung: Proteinbindende Derivate von Platinkomplexen
mit Cyclobutan-1,1-dicarboxylatliganden
IPC: C 07 F, A 61 K, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Hintermeier

WEICKMANN & WEICKMANN

Patentanwälte
European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN (bis 31.1.01)
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN
DIPL.-CHEM. B. HUBER
DR.-ING. H. LISKA
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL
DIPL.-CHEM. DR. B. BOHM
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSPERGER
DIPL.-PHYS. DR.-ING. V. JORDAN
DIPL.-CHEM. DR. M. DEY
DIPL.-FORSTW. DR. J. LACHNIT

Unser Zeichen:
30073P DE/HBwr

Anmelder:
KTB Tumorforschungs GmbH
Breisacher Straße 17

79106 Freiburg

Proteinbindende Derivate von Platinkomplexen mit Cyclobutan-1,1-di-carboxylatliganden

Proteinbindende Derivate von Platinkomplexen mit Cyclobutan-1,1-di-carboxylatliganden

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft niedermolekulare Platinkomplexe von Cyclobutan-1,1-dicarboxylatliganden, die eine proteinbindende Gruppe enthalten, deren Herstellung und Verwendung.

10

Carboplatin (Diamminplatin(II)-cyclobutan-1,1-dicarboxylat) ist ein anti-neoplastisch wirksamer Platin(II)-Komplex, der zur Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt wird (Woloschuk, D. M. et al., *Drug Intell. Clin. Pharm.* 1988, 22, 843-849). Von dem strukturell verwandten Cisplatin (*cis*-Diammildichloroplatin(II)) unterscheidet sich Carboplatin durch Austausch der Chloroliganden durch einen chelatisierenden Cyclobutan-1,1-dicarboxylatliganden, woraus eine veränderte Pharmakokinetik sowie ein von Cisplatin abweichendes Toxizitätsprofil resultiert (Lokich, J., *Cancer Invest.* 2001, 19, 756-760). Jedoch sind Therapien mit Carboplatin von Nebenwirkungen begleitet (Go, R. S. et al., *J Clin. Oncol.* 1999, 17, 409-422). Es wurde bereits vorgeschlagen, zur Verbesserung des Nebenwirkungsprofils und der Wirksamkeit von Zytostatika proteinbindende Formulierungen zu entwickeln, welche *in vivo* an endogene Serumproteine koppeln und auf diese Weise makromolekulare Transportformen der Wirkstoffe darstellen (Kratz, F. et al., *Am. Assoc. Cancer Res.* 2001, 42, 138-139, Kratz, F. et al., *J. Med. Chem.* 2000, 43, 1253-1256).

15

20

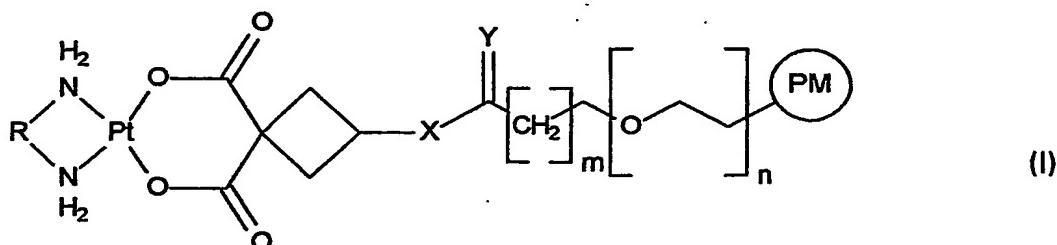
25

30

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, proteinbindende Derivate von Carboplatin zu schaffen, welche weniger unerwünschte Nebenwirkungen und höhere Wirksamkeit gegenüber Tumorgewebe aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch niedermolekulare Carbo-platin-Derivate der allgemeinen Formel I

5



10

worin R = 2 H, , -(CH₂)_i (i = 2 oder 3), X = O oder NH, Y = O, S oder 2 H, n = 0 bis 5, m = 0 bis 6 bedeuten und PM eine Proteinbindende Gruppe ist.

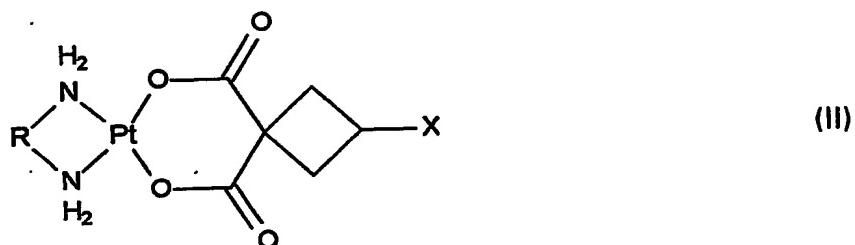
15

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind aus einem antitumoral wirksamen *cis*-konfigurierten Platin(II)-Komplex und einem heterobifunktionellen Crosslinker aufgebaut. Im Folgenden wird dieser Aufbau näher erläutert:

20

Der antitumoral wirksame Platinkomplex ist ein Wirkstoffderivat der allgemeinen Formel II

25

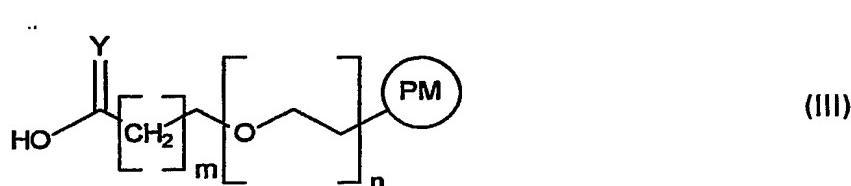


30

worin R = 2 H, , -(CH₂)_i (i = 2 oder 3)
X = OH oder NH₂

bedeuten. Von dem klinischen Standard Carboplatin unterscheidet sich dieser durch das Vorliegen einer Hydroxy- oder Aminogruppe am Cyclobutanring sowie gegebenenfalls durch Vorliegen chelatisierender Aminligan- den wie *trans*-1,2-Diaminocyclohexan, *cis*-1,2-Diaminocyclohexan, Ethylen- diamin oder 1,3-Diaminopropan.

Der heterobifunktionelle Crosslinker ist ein Carbonsäure-Derivat oder ein Alkohol mit einer proteinbindenden Gruppe der allgemeinen Formel III



in der

T - 211, 8

Page 8

PM = Proteinbindende Gruppe

bedeuten

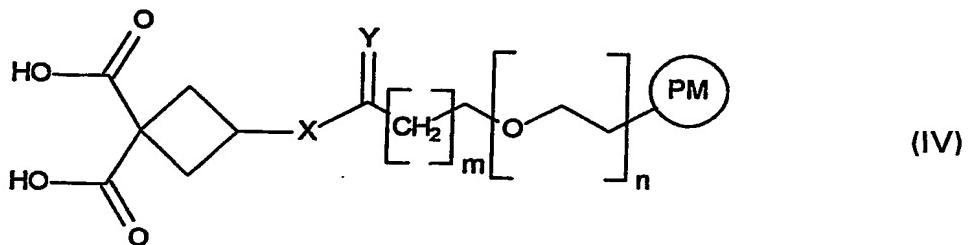
Die proteinbindende Gruppe (PM) ist bevorzugt ausgewählt unter einer 2-Dithiopyridylgruppe, einer Halogenacetamidgruppe, einer Halogenacetatgruppe, einer Disulfidgruppe, einer Acrylsäureestergruppe, einer Monoalkylmaleinsäureestergruppe, einer Monoalkylmaleaminsäureamidgruppe, einer *N*-Hydroxysuccinimidylestergruppe, einer Isothiocyanatgruppe, einer Aziridingruppe oder einer Maleinimidgruppe. Eine besonders bevorzugte proteinbindende Gruppe ist die Maleinimidgruppe.

Erfundungsgemäße Verbindungen werden formal durch Kondensation des Wirkstoffderivats mit dem Crosslinker erhalten. Zwischen Wirkstoffderivat

und Crosslinker liegt daher eine Esterbindung, eine Amidbindung, eine Thioesterbindung, eine Thioamidbindung, eine Etherbindung oder eine Aminbindung vor.

- 5 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Platinkomplexe erfolgt bevorzugt durch Umsetzung eines Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivats der allgemeinen Formel IV

10



15 in der

X = O oder NH

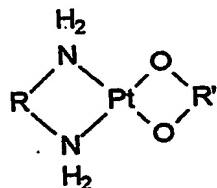
Y = O, S oder 2 H

m = 0 bis 5

n = 0 bis 6

20 und PM eine Proteinbindende Gruppe bedeuten, mit einem Platinkomplex der allgemeinen Formel V

25



(V)

30

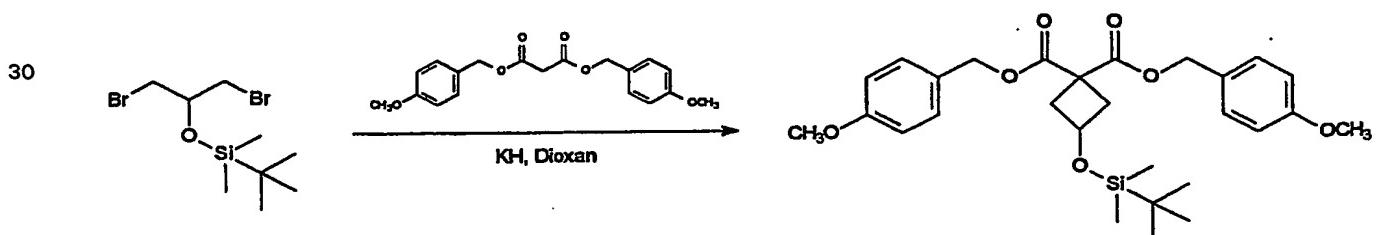
in der

R = 2 H, , , , -(CH2)i- (i = 2 oder 3)

R' = 2 NO2, SO2 oder CO bedeuten.

Zur Umsetzung kann z.B. der Platinkomplex in Wasser gelöst und mit dem Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivat oder einem Alkali- oder Erdalkalimetallsalz des Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivats versetzt werden. Die Umsetzungen werden zweckmäßig bei Temperaturen zwischen 0 °C und 5 50 °C durchgeführt, wobei die Reaktionszeit normalerweise zwischen 1 und 24 Stunden liegt. Die Produktisolierung kann durch übliche Methoden wie Kristallisation, Chromatographie an Kieselgel oder Reversed-Phase-Chromatographie (präparative HPLC) erfolgen.

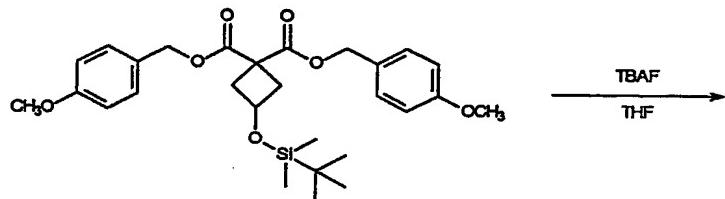
- 10 Nach einer bevorzugten Ausführungsweise wird eine wässrige Lösung eines *cis*-Diaminoalkylplatin(II)dinitrat-Komplexes oder *cis*-Diamminplatin(II)dinitrat mit einem Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivat, welches eine Maleinimidgruppe und ein Oligo(ethylenglykol)-Rückgrat aufweist, bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 umgesetzt. Die Reinigung der so erhaltenen Platinkomplexe erfolgt vorzugsweise durch Säulenchromatographie an Kieselgel oder durch Reversed-Phase-Chromatographie (siehe Beispiele 5, 15 6 und 9). Auf diese Weise erhaltene Platinkomplexe weisen eine exzellente Wasserlöslichkeit auf.
- 20 Die für die Komplexbildung bevorzugt eingesetzten Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivate mit einer Maleinimidgruppe und einem Oligo(ethylenglykol)-Rückgrat lassen sich in einer vierstufigen Synthese ausgehend von Bis(4-methoxybenzyl)malonat und 1,3-Dibrom-2-*tert*.-butyldimethylsiloxypropan herstellen:
- 25 Im ersten Schritt erfolgt eine Dialkylierung von Bis(4-methoxybenzyl)malonat mit 1,3-Dibrom-2-*tert*.-butyldimethylsiloxypropan, die zum Cyclobutanringsystem führt.



Diese Reaktion wird bevorzugt in einem aprotischen Lösungsmittel wie Dioxan oder DMF unter Benutzung von Basen wie Kaliumumhydrid oder Natriumhexamethyldisilazid bei Raumtemperatur ausgeführt. Typischerweise beträgt die Reaktionszeit 5 48-120 Stunden (siehe Beispiel 1).

Im zweiten Schritt erfolgt die Abspaltung der TMS-silyl-Schutzgruppe nach Methoden, die den Autor nicht benennt, bevorzugt unter Einsatz von Tetrabutylammoniumfluorid (siehe Beispiel 2).
10

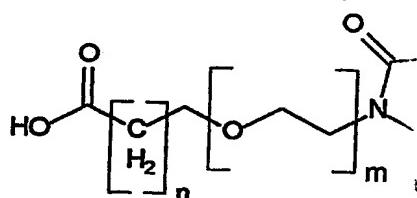
15



Im dritten Schritt erfolgt die Veresterung der 20 butanrings von Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxybutanide mit einer Maleinimidocarbonsäure der allgemeinen
Formel:

25

30



in der

n = 0 bis 5

m = 0 bis 6

bedeuten.

5

Dabei werden als Reagenzien zur Aktivierung der Carboxylgruppe des Crosslinkers vorzugsweise *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium-Hexafluorophosphat oder 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid unter Zusatz gängiger

10

Katalysatoren bzw. Hilfsbasen wie z.B. Trialkylamine, Pyridin, 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) oder Hydroxybenzotriazol (HOBr) eingesetzt. Die Umsetzung erfolgt zweckmäßig in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in Dichlormethan, *N,N*-Dimethylformamid und Tetrahydrofuran. Die Umsetzungen werden zweckmäßig bei Temperaturen zwischen -10 °C bis Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Reaktionszeit

15

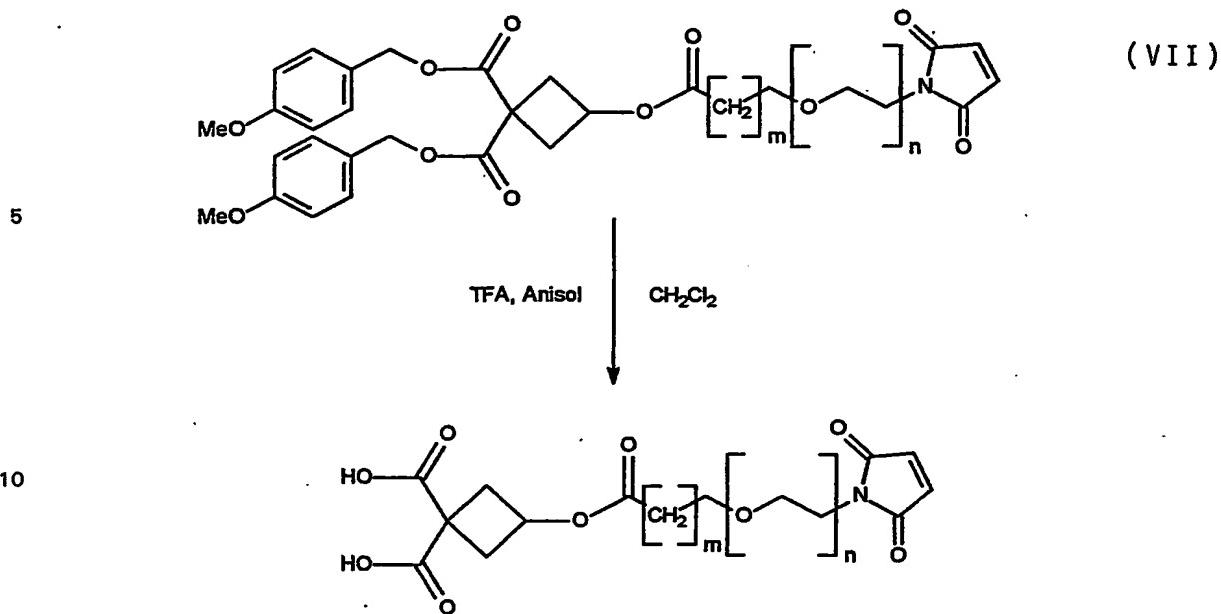
normalerweise zwischen 3 und 48 Stunden liegt.

20

Nach einer bevorzugten Ausführungsweise wird Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxycyclobutan-1,1-dicarboxylat mit einer Maleinimidocarbon-säure, welche ein Oligo(ethylenglykol)-Rückgrat aufweist, unter Einsatz von 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid umgesetzt (siehe Beispiele 3 und 7) unter Bildung einer Verbindung der allgemeinen Formel VII.

25

Im vierten Schritt erfolgt die Abspaltung der 4-Methoxybenzyl-Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure und Anisol bei 0°C (siehe Beispiele 4 und 8).



Ein wesentliches Merkmal der erfindungsgemäßen Platinkomplexe liegt in einer raschen kovalenten Bindung an Serumproteine über die proteinbindende Gruppe, wodurch eine makromolekulare Transportform des Wirkstoffs generiert wird. Von Serumproteinen wie Transferrin, Albumin und LDL ist eine erhöhte Aufnahme in Tumorgewebe bekannt (Kratz F.; Beyer U. *Drug Delivery* 1998, 5, 281-299), sodass diese im Rahmen der Erfindung als endogene Träger für Zytostatika herangezogen werden können. Ein besonders bevorzugtes Serumprotein ist zirkulierendes Humanserumalbumin (HSA), das mit einer durchschnittlichen Konzentration von 30 bis 50 g/L die Hauptprotein-Komponente des menschlichen Blutes bildet (Peters T. *Adv. Protein Chem.* 1985, 37, 161-245) und eine freie Cysteingruppe (Cystein-34-Gruppe) an der Oberfläche des Proteins aufweist, welche zur Anbindung von thiolbindenden Gruppen wie Maleimididen oder Disulfiden geeignet ist (WO 00/76551).

Die erfindungsgemäßen proteinbindenden Platinkomplexe können als Arzneimittel parenteral, bevorzugt intravenös appliziert werden. Dazu werden die erfindungsgemäßen Platinkomplexe als Lösungen, Feststoffe

oder Lyophilisate, gegebenenfalls unter Verwendung üblicher Hilfsstoffe bereitgestellt. Solche Hilfsstoffe sind beispielsweise Polysorbate, Glucose, Lactose, Mannitol, Dextrane, Zitronensäure, Tromethamol, Triethanolamin, Aminoessigsäure und/oder synthetische Polymere. Die applizierten Komplexe reagieren dann mit Serumproteinen unter Bildung der Transportform.

Die Reaktion der neuen Platinkomplexe mit Serumproteinen kann alternativ auch extrakorporal durchgeführt werden, z.B. mit einer zur Infusion vorgesehenen Albumin-, Blut- oder Serummenge.

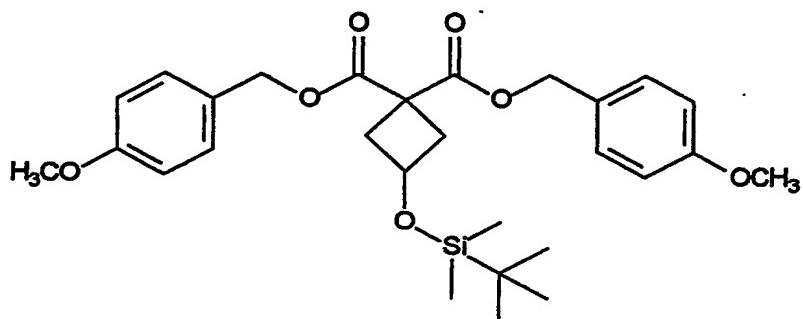
Protein-gebundene Platinkomplexe gemäß der Erfindung weisen gegenüber herkömmlichen niedermolekularen Komplexen eine veränderte Pharmakokinetik auf und reichern sich aufgrund ihres makromolekularen Charakters in Tumorgewebe an. Durch eine intrazellulär stattfindende Hydrolyse-Reaktion wird der labil-gebundene Cyclobutan-1,1-dicarboxylatligand abgespalten und dabei werden Aquo-, Hydroxy- oder gemischte Aquohydroxykomplexe als aktive Komponenten freigesetzt. In Tierversuchsstudien zeigten diese proteinbindenden Platinkomplexe eine höhere Wirksamkeit als der klinische Standard Carboplatin (siehe Beispiel 10).

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung in Verbindung mit der Zeichnung näher. Die Zeichnung stellt graphisch die Ergebnisse eines Tierversuchs mit einer Substanz gemäß Erfindung im Vergleich zu Carboplatin anhand der Änderung des Tumorvolumens dar.

Beispiel 1

Herstellung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-*tert*.-butyldimethyl-siloxycyclobutan-1,1-dicarboxylat (PMB-CB-OTBS)

5



10

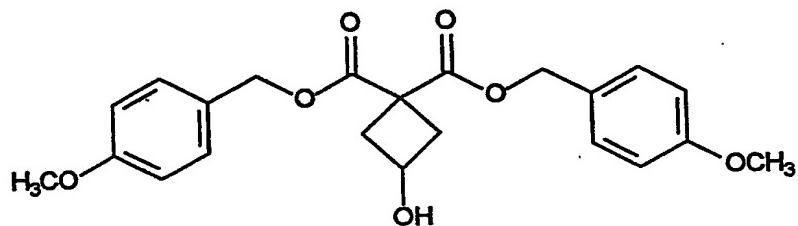
Zu einer Suspension von Kaliumhydrid (35 % in Mineralöl) (2.10 g, 18.29 mmol) in 20 mL wasserfreiem Dioxan wird unter Inertgasatmosphäre Bis(4-methoxybenzyl)malonat (6.00 g, 17.4 mmol) innerhalb 30 min zugeropft. Man lässt weitere 15 min bei Raumtemperatur röhren, versetzt mit 1,3-Dibrom-2-*tert*.-butyldimethylsiloxypropan (6.08 g, 18.29 mmol) und erhitzt über Nacht unter Rückfluss. Zu der auf Raumtemperatur abgekühlten Reaktionsmischung wird Kaliumhydrid (35 % in Mineralöl) (2.10 g, 18.29 mmol) als Suspension in 10 mL Dioxan langsam gegeben. Anschließend wird drei weitere Tage unter Rückfluss gerührt. Das gebildete Kaliumbromid wird über Celite abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Ethylacetat/Isohexan 1:10) gereinigt. Man erhält 2.78 g PMB-CB-OTBS (31 % d. Theorie) als farbloses Öl.

Beispiel 2

Herstellung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxycyclobutan-1,1-di-carboxylat (PMB-CB-OH)

30

5



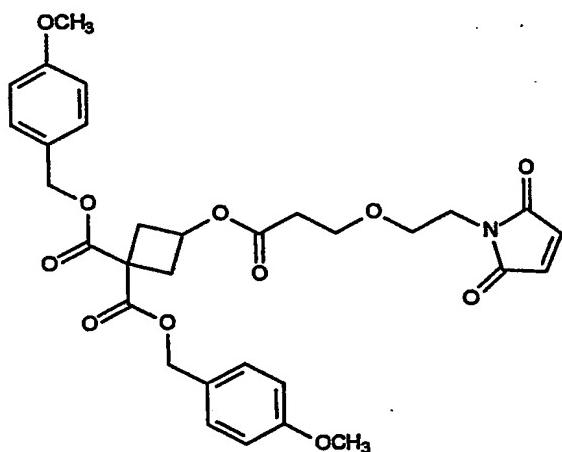
Eine Lösung von PMB-CB-OTBS (2.69 g, 5.23 mmol) in 25 mL wasserfreiem THF wird mit Tetrabutylammoniumfluorid (2.47 g, 7.85 mmol) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Ethylacetat/Isohexan 1:1) gereinigt. Man erhält 1.85 g PMB-CB-OH (88 % d. Theorie) als farbloses Öl, das langsam kristallisiert.

15

Beispiel 3

Herstellung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-(6-maleinimido-4-oxacaproyl)cyclobutan-1,1-dicarboxylat (PMB-CB-1-Mal)

20



25

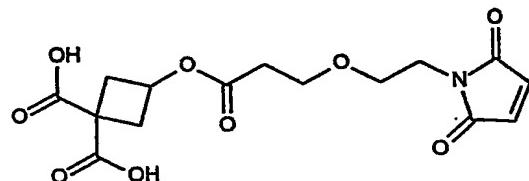
30

Eine Lösung von PMB-CB-OH (1.97 g, 4.91 mmol), 6-Maleinimido-4-oxacapro-
5. pronsäure (1.57 g, 7.37 mmol) und Triethylamin (2.04 mL, 8.64 mmol) in
30 mL wasserfreiem Dichlormethan wird mit 2-Chlor-1-methylpyridinium-
iodid (1.88 g, 7.37 mmol) versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur
gerührt. Man verdünnt mit 140 mL Dichlormethan, wäscht jeweils zweimal
mit 80 mL Salzsäure 1n, 80 mL Wasser sowie einmal mit 80 mL Natrium-
chloridlösung (ges.) und trocknet über Magnesiumsulfat. Anschließend wird
das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromato-
graphisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol 200:1) gereinigt. Man erhält
10. 2.89 g PMB-CB-1-Mal (99 % d. Theorie) als farbloses Öl.

Beispiel 4

Herstellung von 3-(6-Maleinimido-4-oxacaproyl)cyclobutan-1,1-di-carbon-
säure (COOH-CB-1-Mal)

15



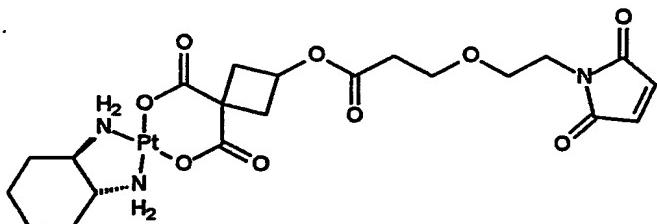
20

Eine Lösung von PMB-CB-1-Mal (2.76 g, 4.63 mmol) und Anisol (7.57 mL,
69.5 mmol) in 50 mL wasserfreiem Dichlormethan wird bei 0 °C mit 10 mL
Trifluoressigsäure versetzt und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. An-
schließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand
25. säulenchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol 20:1) gereinigt.
Man erhält 1.28 g COOH-CB-1-Mal (78 % d. Theorie) als farblosen Sirup.

Beispiel 5

30. Herstellung von *trans*-(*R,R/S,S*)-Cyclohexan-1,2-diaminoplatin(II)-
[3-(6-maleinimido-4-oxacaproyl)cyclobutan-1,1-dicarboxylat]
(DACH-Pt-CB-1-Mal)

5



Zu einer auf Raumtemperatur abgekühlten wässrigen Lösung von [Pt
trans-DACH](NO₃)₂ (300 mg, 692 µmol), die man durch Erhitzen (50 °C)
des Platinkomplexes mit 60 mL Wasser erhält, wird eine Lösung von
COOH-CB-1-Mal (271 mg, 762 µmol) in 5 mL Wasser gegeben. Die Reak-
tionsmischung wird mit 0.1 M KOH auf pH 5.5 eingestellt und drei Stunden
bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt. Anschließend wird das
Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulenchroma-
tographie (Kieselgel, Ethanol) gereinigt. Man erhält 291 mg
DACH-Pt-CB-1-Mal (61 % d. Theorie) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (CD₃OD):

δ = 0.97-1.29 (m, 4H, Cyclohexyl-H), 1.38-1.56 (m, 2H, Cyclohexyl-H),
1.81-1.96 (m, 2H, Cyclohexyl-H), 2.19-2.36 (m, 2H, Cyclohexyl-H), 2.42
(t, J = 5.9 Hz, CH₂COO), 2.60-2.79 (m, 2H, CH₂CHOR), 3.27-3.41 (m,
2H, CH₂CHOR), 3.46-3.66 (m, 6H, NCH₂, OCH₂), 4.67-4.86 (m, 1H,
CHOR), 6.76 (s, 2H, C(O)CH=CHCO)

25

¹³C-NMR (CD₃OD):

δ = 25.51, 33.30 (Cyclohexyl), 35.92 (CH₂COO), 38.17 (NCH₂),
39.80/40.09 (CH₂CHOR), 51.35 (C(COOH)₂), 63.81/63.86
(Cyclohexyl-NH₂), 65.66 (CHOR), 67.22, 68.65 (OCH₂), 135.50
(C(O)CH=CHCO), 172.52, 172.80 (C(O)CH=CHCO, CH₂COO), 180.41,
180.61 (C(COOH)₂).

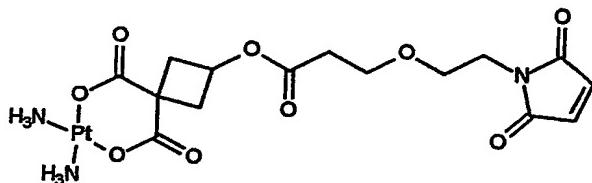
ESI-MS (4.0 kV, MeOH):

m/z (%) 663.0 ([M + 1]⁺, 100)

Beispiel 6

5 **Herstellung von Diamminplatin(II)-[3-(6-maleinimido-4-oxacaproyl)
cyclobutan-1,1-dicarboxylat] ((NH₃)₂-Pt-CB-1-Mal)**

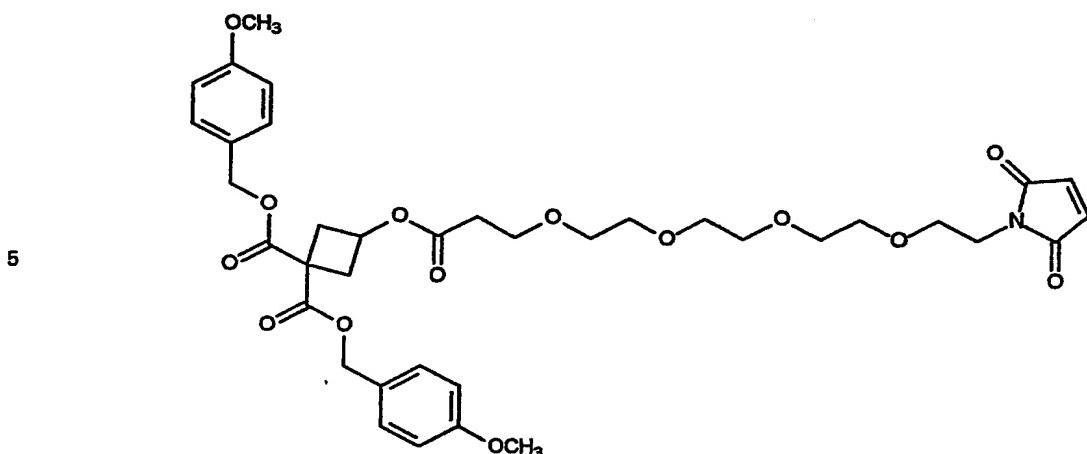
10



- 15 Zu einer auf Raumtemperatur abgekühlten wässrigen Lösung von [(NH₃)₂Pt](NO₃)₂ (485 mg, 1.37 mmol), die man durch Erhitzen (50 °C) des Platinkomplexes mit 90 mL Wasser erhält, wird eine Lösung von COOH-CB-1-Mal (538 mg, 1.51 mmol) in 5 mL Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 0.1 M KOH auf pH 5.5 eingestellt und drei
20 Stunden bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Säulen-chromatographie (Kieselgel, Ethanol) gereinigt. Man erhält 263 mg (NH₃)₂-Pt-CB-1-Mal (33 % d. Theorie) als farblosen Feststoff.
- 25 ESI-MS:
m/z (%) 581.8 ([M]⁺, 100)

Beispiel 7

30 **Herstellung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-(15-maleinimido-4,7,10,
13-tetraoxapentadecanoyl)cyclobutan-1,1-dicarboxylat (PMB-CB-4-Mal)**

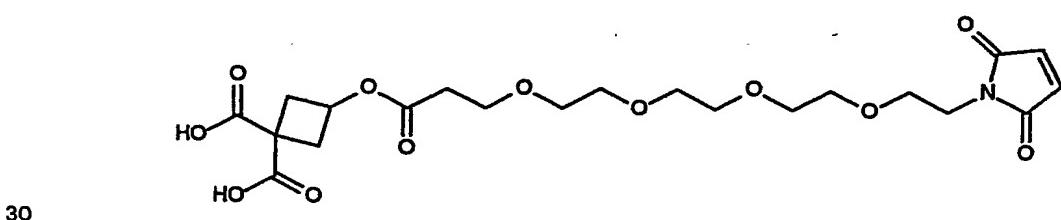


10 Eine Lösung von PMB-CB-OH (1.154 g, 2.881 mmol), 15-Malein-imido-4,7,10,13-tetroxapentadecansäure (1.49 g, 4.32 mmol) und Triethyl-amin (1.20 mL, 8.64 mmol) in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan wird mit 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid (1.10 g, 4.32 mmol) versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Man verdünnt mit 80 mL Dichlormethan, wäscht jeweils zweimal mit 50 mL Salzsäure 1n, 50 mL Wasser sowie einmal mit 50 mL Natriumchloridlösung (ges.) und trocknet über Magnesiumsulfat. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Ethylacetat) gereinigt. Man erhält 1.93 g PMB-CB-4-Mal (92 % d. Theorie) als farbloses Öl.

Beispiel 8

Herstellung von 3-(15-Maleinimido-4,7,10,13-tetroxapentadecanoyl)cyclobutan-1,1-dicarbonsäure (COOH-CB-4-Mal)

25

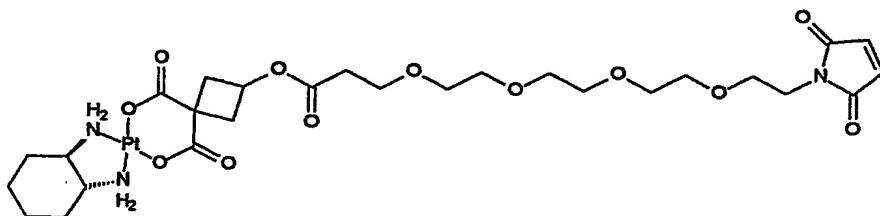


Eine Lösung von PMB-CB-4-Mal (1.94 g, 2.66 mmol) und Anisol (4.35 mL, 39.9 mmol) in 50 mL wasserfreiem Dichlormethan wird bei 0 °C mit 10 mL Trifluoressigsäure versetzt und zwei Stunden bei 0 °C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Methanol 10:1) gereinigt. Man erhält 1.15 g COOH-CB-4-Mal (89 % d. Theorie) als farblosen Sirup.

Beispiel 9

Herstellung von *trans*-(*R,R/S,S*)-Cyclohexan-1,2-diaminoplatin(II)-[3-(15-maleinimido-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl)cyclo-butan-1,1-dicarboxylat]

(DACH-Pt-CB-4-Mal)



Zu einer auf Raumtemperatur abgekühlten wässrigen Lösung von [Pt *trans*-DACH](NO₃)₂ (175 mg, 405 µmol), die man durch Erhitzen (50 °C) des Platinkomplexes mit 30 mL Wasser erhält, wird eine Lösung von COOH-CB-4-Mal (217 mg, 445 µmol) in 5 mL Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird mit 0.1 M KOH auf pH 5.5 eingestellt und drei Stunden bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt. Anschließend engt man im Vakuum auf ca. 5 mL ein und zentrifugiert den Niederschlag ab. Der Überstand wird durch präparative HPLC (Nucleosil® 100-7-C18-Säule (250 x 15 mm), Wasser/Acetonitril 80:20 + 0.05 % TFA, Fluss: 20 mL/min, Retentionszeit: ca. 20 min) gereinigt. Nach Entfernen des Laufmittels im Vakuum und Kristallisation des Rückstandes durch Zugabe von ca. 1 mL 2-Propanol

erhält man 60 mg DACH-Pt-CB-4-Mal (19 % d. Theorie) als farblosen Feststoff.

¹H-NMR (D₂O, geeicht auf Aceton $\delta \equiv$ 2.20 ppm):

5 $\delta =$ 0.98-1.35 (m, 4H, Cyclohexyl-H), 1.44-1.62 (m, 2H, Cyclohexyl-H),
1.94-2.06 (m, 2H, Cyclohexyl-H), 2.28-2.48 (m, 2H, Cyclohexyl-H), 2.66
(t, J = 6.0 Hz, CH₂COO), 2.80-2.93 (m, 2H, CH₂CHOR), 3.34-3.50 (m,
2H, CH₂CHOR), 3.54-3.84 (m, 18H, NCH₂, OCH₂), 4.93 ('p', J = 7.1 Hz,
1H, CHOR), 6.85 (s, 2H, C(O)CH=CHCO)

10

¹³C-NMR (D₂O, geeicht auf Aceton):

5 $\delta =$ 24.30, 32.22 (Cyclohexyl), 34.91 (CH₂COO), 37.37 (NCH₂),
38.54/38.72 (CH₂CHOR), 50.71 (C(COOH)₂), 63.05/63.09
15 (Cyclohexyl-NH₂), 65.37 (CHOR), 66.52, 68.02, 69.73, 69.97, 70.01
(OCH₂), 134.86 (C(O)CH=CHCO), 173.39, 174.11 (C(O)CH=CHCO,
CH₂CCOO), 180.30, 180.47 (C(COOH)₂)

20 ¹⁹⁵Pt-NMR (D₂O): $\delta =$ -311

IR (KBr): $\nu =$ 3448 (ss, b), 2934 (w, b), 1709 (ss), 1627 (s), 1353 (m),
1094 (ss, b), 696 (w) cm⁻¹

25 ESI-MS (4.0 kV, MeOH): m/z (%) 816.9 ([M+Na]⁺, 100)

C₂₇H₄₁N₃O₁₂Pt [794.71]

Elementaranalyse: berechnet: C: 40.81 % H: 5.20 % N: 5.29 %
 gefunden: C: 39.88 % H: 5.16 % N: 5.08 %

30 **Beispiel 10**

Wirksamkeit von DACH-Pt-CB-1-Mal *in vivo*

Die in Abbildung 1 aufgeführten biologischen Daten verdeutlichen eine erhöhte in-vivo-Wirksamkeit von DACH-Pt-CB-1-Mal im Vergleich zu Carboplatins.

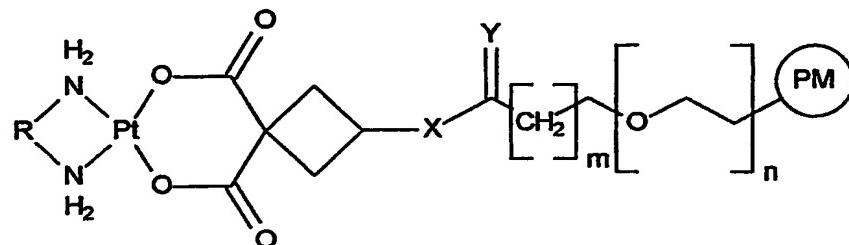
- 5 **Tiere:** Nacktmäuse **Tumormodell:** MaTu (Mammakarzinom)
Therapie: DACH-Pt-CB-1-Mal (75 und 100 mg/kg) sowie Carboplatin (100 mg/kg) einmalig an Tag 7, Carboplatin (75 mg/kg) jeweils an den Tagen 7 und 14; i.v. (Carboplatin und Derivate in jeweils 0.15 0.3 mL Glucose-Phosphat-Puffer pH 6.5).

Ansprüche

1. Platinkomplex der allgemeinen Formel I:

5

10



worin

15

R = 2 H, , , , -(CH₂)_i- (i = 2 oder 3);

X = O oder NH;

Y = O, S oder 2 H;

m = 0 bis 5;

20

n = 0 bis 6;

PM eine Proteinbindende Gruppe bedeutet.

25

2. Platinkomplex gemäß Anspruch 1,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

30

dass PM eine Maleimidgruppe, eine 2-Dithiopyridylgruppe, eine Halogenacetamidgruppe, eine Halogenacetatgruppe, eine Disulfidgruppe, eine Acrylsäureestergruppe, eine Monoalkylmaleinsäureestergruppe, eine Monoalkylmaleaminsäureamidgruppe, eine N-Hydroxysuccinimidylestergruppe, eine Isothiocyanatgruppe oder eine Aziridin gruppe ist, die gegebenenfalls substituiert sein können.

3. Platinkomplex nach Anspruch 2,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass PM eine Maleinimidgruppe ist, die gegebenenfalls substituiert
sein kann.

5 4. Platinkomplex gemäß Anspruch 3,

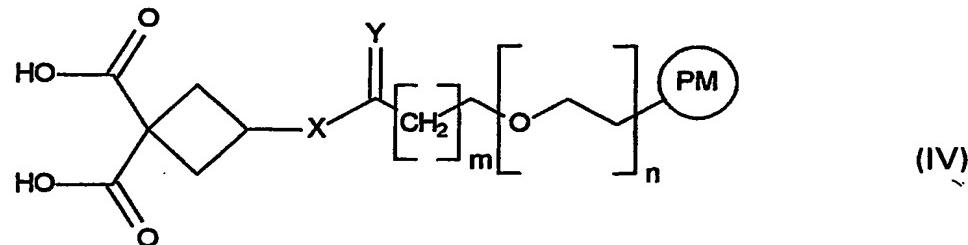
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass $m < 2$ und $n = 1$ bis 4 ist.

10 5. Platinkomplex nach Anspruch 4,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass $X = O$ und $Y = O$ ist.

15 6. Verfahren zur Herstellung von Platinkomplexen nach einem der
vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass ein Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivat der allgemeinen
Formel IV



25

in der

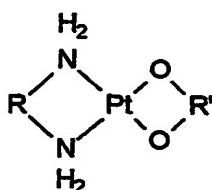
$X = O$ oder NH

$Y = O, S$ oder $2 H$

$m = 0$ bis 5

30 $n = 0$ bis 6

und PM eine Proteinbindende Gruppe bedeuten, mit einem Platinkomplex der allgemeinen Formel V



(V)

5

in der

R = 2 H, , , , -(CH₂)_i (i = 2 oder 3)
R' = 2 NO₂, SO₂ oder CO bedeuten, umgesetzt wird.

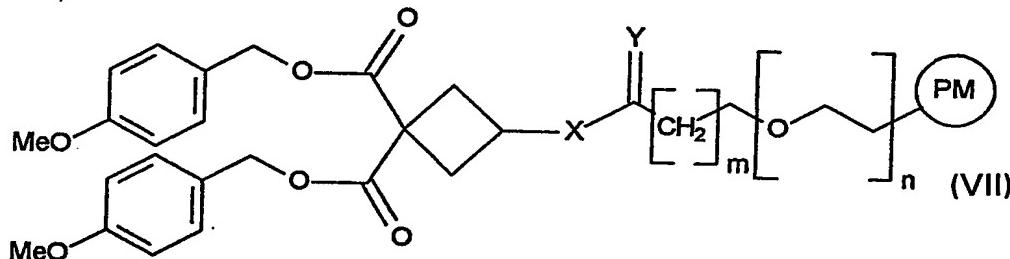
10

7. Verfahren nach Anspruch 6,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

dass das Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivat der allgemeinen Formel II durch Umsetzung eines 4-Methoxybenzyl-geschützen Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivats der allgemeinen Formel VII

15



20

in der

25

X = O oder NH

Y = O, S oder 2 H

m = 0 bis 5

n = 0 bis 6

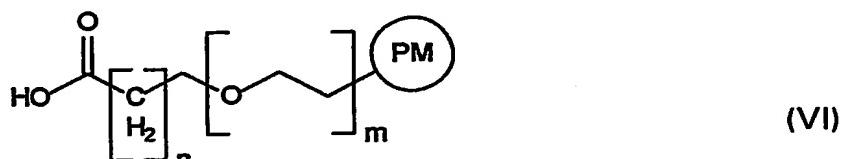
30

und PM eine Proteinbindende Gruppe bedeuten, mit Trifluoressigsäure und Anisol erhalten wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7,

5 durch gekennzeichnet,
dass das Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure-Derivat der allgemeinen
Formel VII durch Umsetzung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxy-
cyclobutan-1,1-dicarboxylat mit einem heterobifunktionellen Cross-
linker der allgemeinen Formel VI

10



in der

15 $n = 0, 1$

$m = 1$ bis 6

und PM eine Proteinbindende Gruppe bedeuten, in Gegenwart von
Carbonsäure-Aktivierungsreagenzien erhalten wird.

20 9. Verfahren nach Anspruch 8,

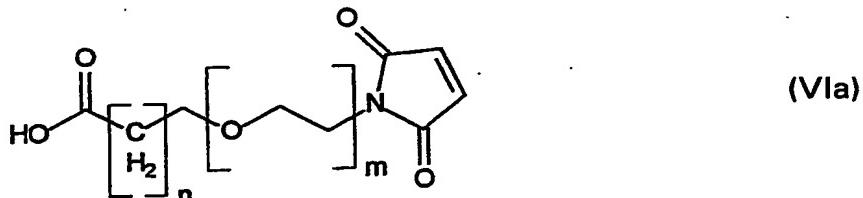
durch gekennzeichnet,

dass als Carbonsäure-Aktivierungsreagenzien N,N' -Dicyclohexylcar-
bodiimid, N,N' -Diisopropylcarbodiimid oder (Benz-
triazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium-Hexafluoro-phos-
phat, am meisten bevorzugt 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid ver-
wendet werden.

30 10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9,

durch gekennzeichnet,

dass man Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxycyclobutan-1,1-dicarboxy-
lat mit einer Maleinimidocarbonsäure der allgemeinen Formel VIa



in der

n = 0, 1

m = 1 bis 6

bedeuten, unter Einsatz von 2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid um-
setzt.

10

11. Verfahren nach Anspruch 8,

dadurch gekennzeichnet,

15

dass Bis(4-methoxybenzyl)-3-hydroxycyclobutan-1,1-dicarboxylat durch Umsetzung von Bis(4-methoxybenzyl)-3-*tert.*-butyl-dimethylsiloxy-cyclobutan-1,1-di-carboxylat mit Tetrabutyl-ammoniumfluorid erhalten wird.

20 12. Verfahren nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet,

dass Bis(4-methoxybenzyl)-3-*tert.*-butyldimethylsiloxy-cyclo-butan-1,1-di-carboxylat durch Umsetzung von Bis(4-methoxybenzyl)malonat mit 1,3-Dibrom-2-*tert.*-butyldimethyl-siloxypropan erhalten wird.

25

13. Arzneimittel enthaltend als Wirkstoff einen Platinkomplex gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfsstoffen und/oder pharmazeutischen Lösungsmitteln.

30

14. Verwendung eines Platinkomplexes nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Behandlung von Krebskrankheiten.

15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von
Krebskrankheiten,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass man eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in
eine therapeutisch annehmbare Lösung überführt.

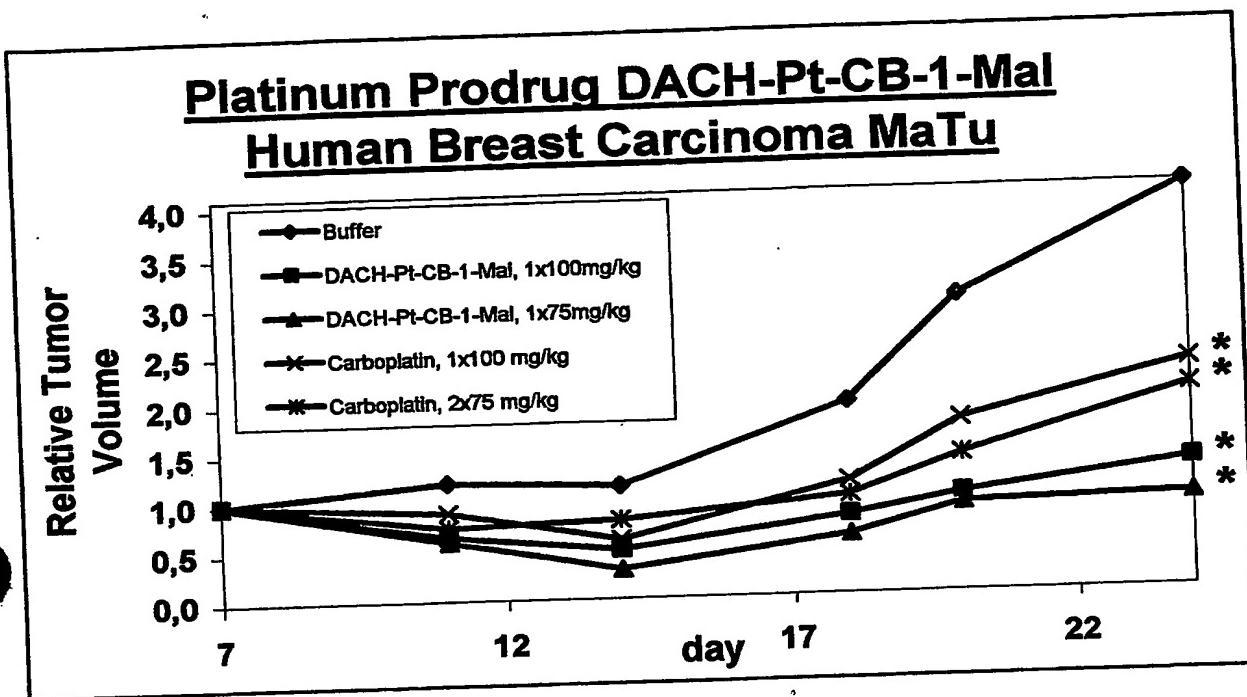
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft niedermolekulare Platinkomplexe mit
5 Cyclobutan-1,1-dicarboxylatliganden, die eine proteinbindende Gruppe
enthalten

wr/ANM/30073PDE-anm/19.03.2003

10

Abbildung 1



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.